

法政大学学術機関リポジトリ  
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

# トウカエデ首垂細菌病菌Erwinia sp.における CRISPR/cas遺伝子クラスターの構造解析に関する研究

著者	前田 典之
出版者	法政大学大学院理工学研究科
雑誌名	法政大学大学院紀要．理工学・工学研究科編
巻	60
ページ	1-3
発行年	2019-03-31
URL	<a href="http://doi.org/10.15002/00022119">http://doi.org/10.15002/00022119</a>

# トウカエデ首垂細菌病菌 *Erwinia* sp. における CRISPR/*cas* 遺伝子クラスターの構造解析に関する研究

STUDY ON CRISPR/CAS GENE CLUSTER FROM *ERWINIA* SP.,  
THE CAUSATIVE AGENT OF BACTERIAL SHOOT DROOPING DISEASE OF *ACER BUERGERIANUM*.

前田典之

Noriyuki MAEDA

指導教員 大島研郎

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻植物医科学領域博士前期課程

*Erwinia* sp. Ta27 is the causal agent of bacterial shoot drooping disease of *Acer buergerianum*. Genome analysis of 689 and Ta27 strains by next generation sequencing suggested that 689 strain had CRISPR/*cas* genes but Ta27 strain had none of the genes. The CRISPR spacer analysis of 689 strain revealed that 71 spacers were present in the two CRISPR regions. Since the spacer is a genomic region in which the nucleotide sequence of phage or plasmid infected with bacteria has been recorded in the past, it can serve as a clue to the evolution and history of bacteria. Among 71 spacer sequences, only four spacers showed sequence homology to plasmids of other bacteria. The remaining spacers are thought to be sequences specific to 689 strain derived from unknown phage or plasmid, and further analysis is needed for these sequences.

**Key Words** : CRISPR, spacer, phage, plasmid

## 1. 緒言

トウカエデ首垂細菌病菌 *Erwinia* sp. はトウカエデ (*Acer buergerianum*) に水浸状の病斑や褐変, 新梢の湾曲, 枯死などを引き起こす病原細菌である。発生生態や感染機構には不明な点が多く, 防除法も確立されていない。

CRISPR/*cas* システムはファージやプラスミドなどの外来 DNA に対する細菌の獲得免疫系として機能する DNA 切断系である。CRISPR はリピート配列とスペーサー配列によって構成されており, その上流には CRISPR-associated genes (*cas* 遺伝子群) が存在する。CRISPR は外来 DNA の配列を格納するための領域であり, 塩基配列が多様性に富むため, *Erwinia amylovora* (リンゴ火傷病菌) の研究において CRISPR 配列の比較分析による系統分類が行われている。本研究ではトウカエデ首垂細菌病菌の CRISPR/*cas* 遺伝子クラスターを調べ, 他の *Erwinia* 属細菌との比較を行うことを目的とした。

## 2. 実験方法

### (1) *Erwinia* sp. の CRISPR 配列解析

東京都西東京市のトウカエデから単離された *Erwinia* sp. Ta27 株 (以下 Ta27 株), および茨城県で単離された *Erwinia* sp. 410689 株 (以下 689 株) を材料として用いた。次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) を用いて Ta27 株と 689 株のゲノム DNA をシーケンスし, 得られたリードを CLC Genomics Workbench (CLC bio) でアセンブルした。また得られたリードを既にゲノム解読されている *E. tasmaniensis* と比較し, マッピングされた配列をもとにプライマーを設計し, PCR 反応を行った。

### (2) *Erwinia* sp. の CRISPR スペーサー解析

CLC Genomics Workbench 上でマッピングし, 得られた 689 株の塩基配列から *cas* 遺伝子群周辺に存在した 2 つの領域に着目した。その領域に関して CRISPR Finder により CRISPR の存在を確認した後 各スペーサーに対して blastn を用いて解析した。

### 3. 結果および考察

#### (1) *Erwinia* sp. の CRISPR 配列解析

これまでの研究により *E. pyrifoliae* は CRISPR/cas 遺伝子クラスターを 2 つ持ち、*E. tasmaniensis* は片方の遺伝子クラスターのみ保持することが明らかにされている (図 1) . 次世代シーケンサーで得られたリードを *E. tasmaniensis* と比較したところ、689 株ではゲノム上に CRISPR 配列の存在が確認され、その上流には *cas* 遺伝子群も認められた (図 1) . 一方、Ta27 株のリード配列は CRISPR/cas 遺伝子クラスター領域にマッピングされなかった。Ta27 株のゲノムに CRISPR/cas 領域が存在しないことを確かめるために、この領域を挟むようにプライマーを設計して PCR を行った (図 2A) . その結果、約 1.1 kbp および約 4.3 kbp の DNA が増幅し (図 2B) , 次世代シーケンスの結果が支持された。以上の結果から、Ta27 株では CRISPR 関連遺伝子である *csy* 遺伝子が部分的に残っているものの、CRISPR 領域と全ての *cas* 遺伝子が欠失していることが明らかとなった (図 1) .

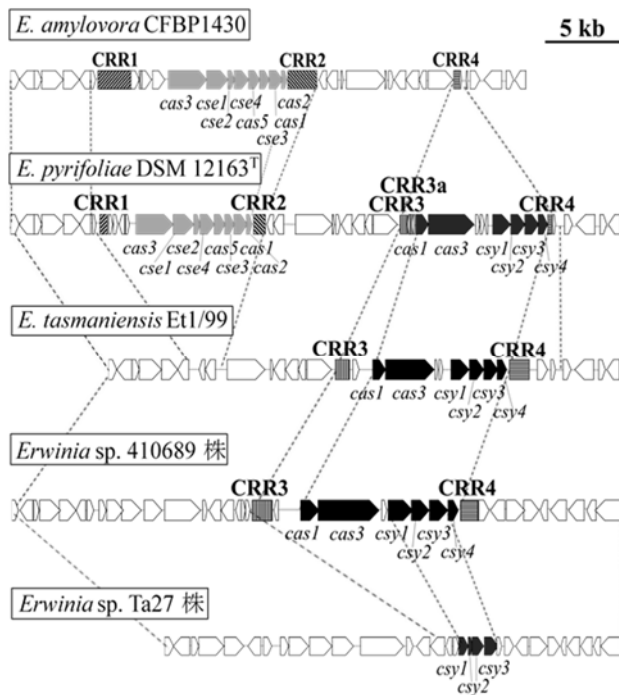


図 1 *Erwinia* 属細菌における CRISPR/cas 遺伝子クラスターの構成。相同な遺伝子領域を点線で示した。CRR = CRISPR 領域。

本研究により、トウカエデ首垂細菌病の CRISPR/cas 遺伝子クラスターの構成には株間で多様性があり、CRISPR/cas を持つ株と持たない株が存在することが示唆された。

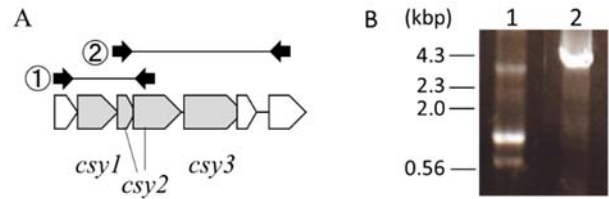


図 2 (A) Ta27 株の *csy* 遺伝子周辺の遺伝子構造。①および②はプライマーのアニール部位を示す。(B) レーン 1: Ta27 株のゲノム DNA を鋳型としてプライマー①で PCR した増幅産物。レーン 2: プライマー②で PCR した増幅産物。

#### (2) CRISPR スペーサー解析

689 株はゲノム上に 2 つの CRISPR 領域を持つことが確認され、それらの領域に挟まれる形で *cas* 遺伝子群が存在する (図 3) . CRISPR 領域のうちスペーサー配列は過去に細菌に感染したファージやプラスミドの塩基配列が格納されているゲノム領域である (図 4) . つまりスペーサーの種類を調べることで、細菌がどのような外来性遺伝子から攻撃を受けたかを知ることになり、その細菌の進化・歴史を知る手がかりとなりうる。また、攻撃を受けるファージやプラスミドは細菌の種や系統によって異なるため、スペーサー配列に格納される配列も多様性に富むことが期待される。そのためスペーサー配列は細菌の種や系統を判別する際の標的として適していると考えられる。これらの理由から CRISPR Finder を用いて解析したところ、2 つの CRISPR 領域内に 71 個のスペーサー配列が存在することが明らかとなった。スペーサーの長さはすべて 30 bp 程度であった。各スペーサーに対して、塩基配列の由来を調べるため blastn で解析した。それぞれのスペーサーを SP01~SP71 のように命名した。SP03 は 32 bp のスペーサー配列であり、*Erwinia amylovora* のプラスミド pEA3 の一部と 100% の相同性を示した (図 5) . これは、689 株が過去に pEA3 様のプラスミドを保持していたことを示している。pEA3 は *E. amylovora* CFBP2585 株が持つ約 30 kbp のプラスミドであり、IV 型分泌システムの遺伝子群をコードする。IV 型分泌システムが接合伝達の線毛から進化した分泌系であり、細菌同士の遺伝子交換に関与することを考えると、pEA3 は細菌間を水平移動するタイプのプラスミドである可能性が考えられる。ただし、実際に 689 株を *E. amylovora* との間でプラスミドの伝達が生じるかについては更なる解析が必要である。SP10 は 32 bp のスペーサー配列であり、Uncultured bacterium のプラスミド pDS1 の一部と 100% の相同性を示した。SP19 は 32bp、SP44 は 33bp のスペーサー配列であり、どちらも *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* のプラスミド pSC7-KPC の一部と 100% の相同性を示した。今回 2 つの CRISPR 領域内に 71 個のスペーサー配列の存在が明らかとなったが、既知の情報をもとに blastn の解析で相同性を示したも

のはわずか4つであった。残りの67個のスペーサー配列は未知のファージやプラスミドに由来する689株特有の配列と考えられ、これらについては今後継続した解析が必要である。



図 3. 689 株の CRISPR 領域周辺の遺伝子構造

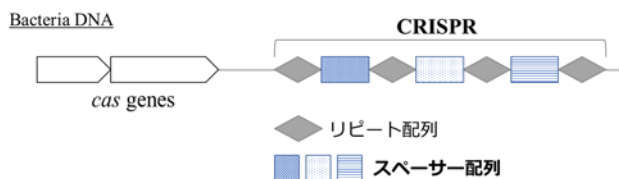


図 4 CRISPR 領域の遺伝子構造.

スペーサーの塩基配列には共通性はない。cas 遺伝子の多くは CRISPR 領域の近傍に位置する。

Spacer No.	Description
SP 03	<i>Erwinia amylovora</i> CFBP 2585 plasmid pEA3
SP 10	Uncultured bacterium plasmid pDS1
SP 19,44	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i> strain SC-7 plasmid pSC7-KPC

図 5. 689 株のスペーサー配列の BLAST 検索結果

#### 4. 謝辞

本研究を行うにあたり、元法政大学 植物医科学専修 安井理美氏、並びに様々なご指導を頂きました皆様に厚く御礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Fabio, R. et al. : Diversity, Evolution, and Functionality of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) Regions in the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora*, Vol. 77, pp.3819-3829, 2011.
- 2) 堀江 博道・菅田 重雄(1987)：東京都におけるトウカエデ首垂細菌病の発生状況と防除，森林防疫，VOL. 36, No. 12, 213-217.